

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam**

Antonela Režan
7119/N

**Primjena blisko-infracrvene spektroskopije u detekciji usitnjenosti
ljekovitog bilja**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Modeliranje i optimiranje u nutricionizmu

Mentor: Doc. dr.sc. *Davor Valinger*

Zagreb, 2017.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenja, regulaciju i automatizaciju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam**

Primjena blisko-infracrvene spektroskopije u detekciji usitnjenosti ljekovitog bilja

Antonela Režan, 7119/N

Sažetak: Ljekovito bilje predstavlja bogat izvor biološki aktivnih spojeva koje mogu imati povoljan utjecaj na zdravlje, a na tržištu danas nalazimo širok spektar pripravaka ljekovitog bilja. Redovno ili linijsko mjerenje veličine čestica dijelova ljekovitog bilja može biti jedan od načina za kontrolu kvalitete određenih proizvoda u kojima se kao sirovina za njihovu proizvodnju koristi ljekovito bilje. Neinvanzivna spektroskopija u bliskom infracrvenom rasponu od 904 do 1699 nm (NIR) primjenjena je za snimanje uzoraka pet različitih biljaka (kadulja, lavanda, matičnjak, menta i majčina dušica) pri sedam različitih veličina čestica (<100 µm, 100 µm, 250 µm, 355 µm, 500 µm, 800 µm i 1000 µm). NIR spektri upotrebljeni su za analizu glavnih komponenata. Cilj ovog rada je bio ispitati mogućnost diferencijacije različite usitnjenosti istih biljaka te različite usitnjenosti različitih biljaka. Rezultati su pokazali da je NIR spektroskopija uspješna prilikom razlikovanja različite usitnjenosti različitih biljaka te njezinu vrlo visoku osjetljivost prilikom različite usitnjenosti istih biljaka.

Ključne riječi: NIR, ljekovito bilje, analiza glavnih komponenata, usitnjenost

Rad sadrži: 31 stranica, 25 slika, 00 tablica, 66 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Doc. dr.sc. *Davor Valinger*

Pomoć pri izradi: Prof. dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić

Datum obrane: 7. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition

Department of Process engineering
Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Application of near infrared spectroscopy for detection of grounded medicinal herbs

Antonela Režan, 7119/N

Abstract: Medicinal plants represent a rich source of biologically active compounds that could have a beneficial effect on health and a wide range of medicinal plants can be found on the market today. Regular or in-line particle size measurement can be one of the ways to control the quality of certain products where medicinal plants are used as raw materials for their production. The non-invasive spectroscopy in the near infrared range of 904 - 1699 nm (NIR) was used to record spectra of five different plants (sage, lavender, lemon balm, mint and thyme) for seven different particle sizes (<100 µm, 100 µm, 250 µm, 355 µm, 500 µm, 800 µm and 1000 µm). NIR spectra were used for principal component analysis. The aim of this study was to examine the possibility of differentiating the different particle size of the same plants and the different particle size of different plants. The results have shown that NIR spectroscopy is successful in differentiating the different particle sizes of different plants and its very high sensitivity to the different particle sizes of the same plants.

Keywords: NIR, medicinal plants, principal component analysis, grounding

Thesis contains: 31 pages, 25 figures, 00 tables, 66 references, 00 supplements

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph. D. *Davor Valinger*, Assistant professor

Technical support and assistance: Ph. D. *Jasenska Gajdoš Kljusurić*, Full professor

Defence date: July 7th 2017

| | |
|---|-----------|
| UVOD | 1 |
| TEORIJSKI DIO | 2 |
| LJEKOVITO BILJE | 2 |
| SAKUPLJANJE LJEKOVITOG BILJA | 2 |
| LJEKOVITO BILJE U HRVATSKOJ | 3 |
| <i>LAMIACEAE</i> (USNAČE) | 3 |
| NEKE LJEKOVITE BILJNE VRSTE U HRVATSKOJ IZ PORODICE <i>LAMIACEAE</i> I NJIHOV KEMIJSKI SASTAV | 3 |
| MENTA (<i>MENTHA X PIPERITA</i> L.) | 3 |
| KADULJA (<i>SALVIA OFFICINALIS</i> L.) | 4 |
| MATIČNJAK (<i>MELISSA OFFICINALES</i> L.) | 5 |
| MAJČINA DUŠICA (<i>THYMUS PULEGIOIDES</i> L.) | 5 |
| LAVANDIN (<i>LAVANDULA X HYBRIDA</i>) | 6 |
| PRIMJENA LJEKOVITOG BILJA U NARODNOJ MEDICINI | 7 |
| OKSIDACIJSKI STRES | 8 |
| ANTIOKSIDANSI | 9 |
| FITOKEMIKALE | 10 |
| FENOLNI SPOJEVI | 11 |
| ČAJ | 13 |
| EKSTRAKTI | 14 |
| USITNJENOST BILJNOG MATERIJALA PRI PRIPREMI PRIPRAVKA | 14 |
| BLISKO INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA - NIR | 14 |
| KEMOMETRIJA | 15 |
| ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI (PCA) | 15 |
| MATERIJALI I METODE | 17 |
| BILJKE: | 17 |
| UREĐAJI I SOFTWARE: | 17 |
| REZULTATI I RASPRAVA | 20 |
| ZAKLJUČAK | 26 |
| POPIS LITERATURE | 27 |

Uvod

Ubrzani ritam života i svakodnevne obaveze ostavljaju jako malo vremena za brigu o pravilnoj prehrani i zdravlju, a posljedično je sve veći broj kroničnih bolesti kao što su rak, krvožilne bolesti i neurodegenerativne bolesti. Smatra se kako su ljekovite biljke učinkovite i sigurne za primjenu u prevenciji navedenih bolesti uz više od tisuću godina iskustva u korištenju (Yang, 2013). Većina ljekovitih biljnih vrsta je najbogatiji prirodni izvor bioaktivnih spojeva u proizvodnji lijekova za tradicionalnu medicinu, funkcionalnih prehrambenih proizvoda, farmaceutskih međuprodukata te dodataka prehrani (Handa i sur., 2008). Porodica *Lamiaceae* je bogata fitokemijskim svojstvima te se mnoge vrste koriste kao ljekovite i začinske biljke. Neke od biljaka iz ove porodice koje se koriste u narodnoj medicini i kao začini su: ljekovita kadulja, lavanda, matičnjak, menta i majčina dušica (Nikolić, 2013). Proveden je velik broj istraživanja kako bi se dokazala učinkovitost moderne biljne medicine, no jedan od glavnih izazova još uvijek je korištenje dobro definiranih i standardiziranih biljaka i biljnih sastojaka. Izdvajanje bioaktivnih komponenti iz ljekovitog bilja je dovelo do razvoja mnogobrojnih metoda za njihovu ekstrakciju, ali također i metoda za praćenje fizikalnih i kemijskih svojstava bioaktivnih komponenata. Danas je znanstvenicima unatoč brojnim analitičkim metodama teško odrediti standarde za određeni proizvod dobiven od ljekovite biljke. Razlog tome mogu biti brojne razlike u kemijskom sastavu, funkcionalna i strukturalna raznolikost kemijskih supstanci prisutnih u biljci te nedosljedne metode za ekstrakciju aktivnih supstanci (Cravotto, 2010). Povećanje tržišnih i potrošačkih želja za kvalitetom hrane s pozitivnim zdravstvenim prednostima stvorilo je potrebu za učinkovitim i točnim analitičkim metodama za procjenu sirovina i gotovih proizvoda. Redovno ili linijsko mjerenje veličine čestica biljnih dijelova može biti jedan od načina za kontrolu kvalitete određenih proizvoda od biljaka. Jedna od metoda za praćenje fizikalnih i kemijskih svojstava prehrambenih proizvoda je NIR spektroskopija. NIR tehnika je specifična i osjetljiva na promjene u kemijskim i fizikalnim svojstvima uzorka koji se analizira te se na taj način može koristiti praćenje autentičnosti i podrijetla različitih proizvoda te kao otisak prsta (fingerprint) u poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji (Cozzolino, 2016).

Cilj ovog rada je bio iskoristiti neinvazivnu spektroskopiju u bliskom infracrvenom području za snimanje uzoraka pet različitih biljaka (kadulja, lavanda, matičnjak, menta i majčina dušica) pri sedam različitih veličina te podatke dobivene NIR spektroskopijom obraditi analizom glavnih komponenata (PCA) kako bi ispitali mogućnost diferencijacije različite usitnjenosti istih biljaka te različite usitnjenosti različitih biljaka.

Teorijski dio

Ljekovito bilje

Potrebe čovjeka oduvijek potiču razvoj prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije a posebnu i sve veću važnost u tim industrijama dobivaju biljke čiji prirodni sastojci se koriste kao osnovne ili pomoćne sirovine za dobivanje ključnih proizvoda u navedenim industrijama. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, ljekovito bilje je vrsta bilja čiji jedan ili više biljnih dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može koristiti u terapijske svrhe ili za potrebe kemijsko-farmaceutske sinteze. Stoga ljekovito bilje ima dvostruku primjenu (Schafner i sur., 1999):

1. U farmaceutskoj industriji se koriste kao sirovine iz kojih se izoliraju čiste prirodne tvari. Te dobivene tvari mogu predstavljati djelotvorni farmaceutski proizvod ili mogu biti jedan od sastojaka za različite kemijsko-farmaceutske sinteze.
2. U terapijske svrhe se koriste na način da se to ljekovito bilje nalazi u različitim mješavinama koje mogu biti dostupne u obliku čajeva, tinktura, ekstrakata ili u obliku gotovih ljekovitih pripravaka (dražeja, kapi, pomasti)

Danas postoji veliki broj vrsta ljekovitog bilja. Divlje vrste zbog povećane potražnje za njima prerastaju u kultivirane, a pojedine se vrste kultiviranog bilja napuštaju zbog jeftinije proizvodnje sintetičkih pripravaka. Prema statističkim podacima Svjetske zdravstvene organizacija (1971.) u farmaceutici je oko 50% aktivnih tvari biljnog podrijetla, što uvjetuje sve veću potražnju za prirodnim sirovinama. Najčešća podjela ljekovitog bilja je na: jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje, drvenasto ili grmoliko (Šilješ i sur., 1992). Zanimanje za plantažni uzgoj ljekovitog bilja kao alternative samoniklom bilju, potaknuta je velikom potražnjom kupaca za takve proizvode te samim time i razvojem tog dijela industrije koje koristi ljekovito bilje za proizvodnju svojih proizvoda. Usmjerenim uzgojem ljekovitog i aromatičnog bilja smanjila bi se nekontrolirana berba samoniklog bilja i time spriječilo njegovo izumiranje (Šilješ i sur. 1992).

Sakupljanje ljekovitog bilja

Za sakupljanje ljekovitog bilja nužno je njihovo dobro poznavanje te je potrebno pridržavati se određenih pravila. Ljekovite tvari nisu u biljci jednoliko raspoređene, stoga je potrebno znati da li treba čitava biljka ili samo njen određeni dio. Koncentracija određenih djelatnih tvari u dijelu biljke varira ovisno o vanjskim faktorima, ali i o razvojnem stadiju u kojem se biljni materijal prikuplja (Parađiković, 2014).

Ljekovito bilje u Hrvatskoj

Republika Hrvatska nalazi se na prostoru gdje dolazi do miješanja više klimatskih utjecaja te je upravo zbog toga jedna od europskih zemalja sa najzanimljivijom florom. Prirodno geografski uvjeti (klimatski, pedološki i hidrografski) iznimno su povoljni između ostalog i za ekološki uzgoj ljekovitog bilja u svim dijelovima Republike Hrvatske. U Hrvatskoj je poznato oko 600 samoniklih biljnih vrsta, a prikuplja se i uzgaja između 160 i 170 autohtonih, ljekovitih, aromatičnih i medonosnih biljnih vrsta (Šiljković, 2005).

***Lamiaceae* (usnače)**

Porodica *Lamiaceae* (usnače) je bogata fitokemijskim svojstvima te se mnoge vrste koriste kao ljekovite i začinske biljke. Poznato je da porodica usnače ima oko 3500 vrsta unutar 210 rodova, a u Republici Hrvatskoj oko 230 vrsta unutar 37 rodova te je rasprostranjena u gotovo svim klimatskim područjima. Ova porodica se vrlo lako prepoznaje po vegetativnim organima te su biljke prisutne većinom kao zeljaste biljke, a rjeđe kao grmovi. Stabljika je četverobridna tj. kvadratnog presjeka s razvijenim uglastim potpornim staničjem, dok su listovi rjeđe pršljenasti, a češće nasuprotni s 3 do 10 listova na pršljenu i aromatskim mirisom. Cvjetovi su dvousnati, pojedinačni ili grade jednostavni cvat, a nakon toga nastaje klas, paštinac, glavica i metlica (Nikolić, 2013).

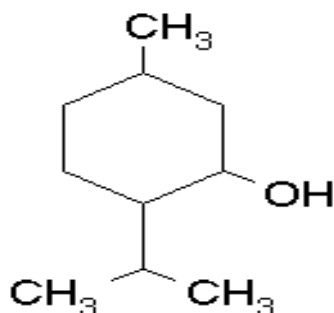
Neke ljekovite biljne vrste u Hrvatskoj iz porodice *Lamiaceae* i njihov kemijski sastav

Menta (*Mentha x piperita* L.)

Menta spada u porodicu *Lamiaceae*, a najraširenija i najpoznatija sorta roda *Mentha* je *Mentha x piperita* L., poznata još pod nazivom pepermint ili paprena metvica. Stablo joj je razgranato i obraslo nasuprotnim ovalno jajastim listovima s nazubljenim rubom koji su većinom tamnozeleno boje (slika 1). Glavni sastojak i aktivna tvar jest eterično ulje, u kojem nalazimo spojeve kao što mentol (kemijska struktura prikazana na slici 2), menton, mentilacetat, mentofurani i pulegon. U lišću ima 1-2% ružmarinske kiseline, fenolkarboksilnih kiselina, triterpenskih kiselina: oko 0,3% ursulske i oko 0,1% oleanolske kiseline, flavonoida: rutin, hesperitin i mentozid, zatim karotenoida, betaina, kolina i 8-13% mineralnih soli (Gursky, 1999).



Slika 1. *Mentha piperita* L. (Baliga, 2010)



Slika 2. Kemijska struktura mentola (Argyropoulos, 2015)

Kadulja (*Salvia officinalis* L.)

Kadulja, žalfija, kuš, slavulja, pelin pitomi samo su neki od naziva za ovu ljekovitu biljnu vrstu iz porodice *Lamiaceae*. To je višegodišnja polugrmovita biljka, koju karakteriziraju dugački listovi, ovalnog oblika te cvjetovi tamnoljubičaste boje (slika 3). Biljka sadrži eterično ulje koje sadržava α i β tujone, cineol, borneol, kamfor i različite terpene te cijeli spektar fenolnih kiselina (galna, klorogenska, ružmarinska i kava) (Križanić, 2005). Iako postoji velika varijabilnost u sastavu glavnih sastojaka eteričnog ulja kadulje, generalno se može reći da su tujoni i kamfor dominantni sastojci (Grdiša, 2015).



Slika 3. Kadulja (Grdiša, 2015)

Matičnjak (*Melissa officinales* L.)

Matičnjak je vrsta trajne biljke iz roda *Lamiaceae* prirodnog staništa u južnoj Europi i mediteranskoj regiji. Nazubljeni, ovalni, svijetlozeleni listovi imaju jak miris po limunu, a stoje nasuprotno u parovima uzduž četvrtaste, razgranate stabljike (slika 4). Kemijski sastav ove biljke čini eterično ulje, koje je gotovo svo sadržano u listovima, ali u vrlo malim količinama od 0.1 - 0.3 % (Brezovec i sur., 2006). Kemijski sastav eteričnog ulja čine citronelal (oko 40%), citral a i b (oko 30%), citronelol, linalol i geraniol. U listu ima i triterpenskih kiselina ursolske i oleanolske, fenilkarboksilnih kiselina (klorogenska, ferula i kavena kiselina), flavonskih heterozida i 10-12% mineralnih soli (Gursky, 1999).



Slika 4. Matičnjak (Medved, 2015)

Majčina dušica (*Thymus pulegioides* L.)

Majčina dušica je grmasta biljka koju ubrajamo u porodicu *Lamiaceae*, a rasprostire se po Europi i Aziji. Ima uske sivo-zelene listiće s kratkim peteljka, a na vrhovima stabljike nalaze se rozi do lila cvjetovi (slika 5) jakog i aromatičnog mirisa. Kemijski sastav majčine dušice čini eterično ulje (0,1-0,6%), čiji su glavni sastojci linalool (22-45%), karvakrol (3-33%), timol (1-4%), geraniol, borneol i cineol. Usto sadrži triterpenske kiseline (ursulna i oleanolna), gorke tvari i tanine i brojne flavonoide (Toplak-Galle, 2005).



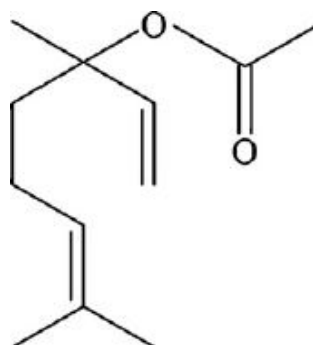
Slika 5. Majčina dušica (Balić Svalina, 2017)

Lavandin (*Lavandula x hybrida*)

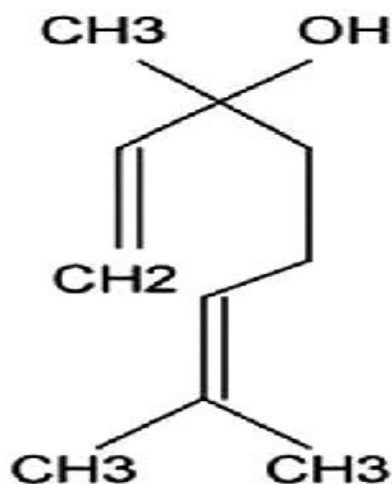
U rod *Lavandula* spada 48 vrsta aromatičnih zimzelenih grmova podrijetlom iz suhih i stjenovitih staništa Sredozemlja, sjeverne Afrike i jugozapadne Azije (Kolak & Šatović, 2003), a sve vrste iz ovog roda karakterizira intenzivna ljubičasto plava boja cvjetova (slika 6) ali i prepoznatljiv miris koji potječe od nakupljenog eteričnog ulja. Najstarija i najpoznatija uzgojna vrsta je prava lavanda - *Lavandula angustifolia* Mill. Lavandini (*Lavandula x hybrida*) su hibridi lavande, za koje je karakteristično da mogu dati pet puta više ulja od prave lavande (Jianu i sur., 2013). Prinos eteričnog ulja prave lavande i lavandina se osim po količini, razlikuje i po zastupljenosti određenih kemijskih komponenti i udjelu eteričnog ulja. Cvijet prave lavande sadrži od 0,5 do 1,5% eteričnog ulja, dok lavandin sadrži od 0,9 do 5% (Šilješ i sur., 1992). Kemijski sastav ulja prave lavande čini linalil acetat (slika 7), linalool (slika 8), lavandulol, 1,8-cineol, lavundulil, acetat i kamfor, dok eterično ulje lavandina sadrži linalool, linalil acetat, kamfor, 1,8- cineol i borneol (Jianu i sur., 2013).



Slika 6. Lavandula (Medved, 2015)



Slika 7. Kemijska struktura linalil acetata (Anderson, 2010)



Slika 8. Kemijska struktura linaloola (Gunaseelan, 2016)

Primjena ljekovitog bilja u narodnoj medicini

Još od davnih vremena te u različitim kulturama širom svijeta ljudi su koristili biljke kao ljekovita sredstva. Prvi zapisi o upotrebi ljekovitog bilja dolaze iz Kine, kada je car Shen Nung sastavio Pen Tsao (The Great Herbal, or Chinese Materia Medica) oko 3000 g.pr. Kr. (Guthrie, 1945). Budući da je čovjek imao malo saznanja o uzrocima različitih bolesti ali i o tome koja se biljka može upotrijebiti za liječenje određene bolesti sve se zasnivalo na iskustvu. Postupno su otkrivani razlozi specifične upotrebe ljekovitog bilja za određene bolesti, te je primjena lijekova postupno izlazila iz empirijskog okvira i zasnivala se na činjenicama. Smatra se kako su ljekovite biljke učinkovite i sigurne za primjenu uz više od tisuću godina iskustva u korištenju (Yang, 2013). Danas je poznato kako brojne ljekovite biljke obiluju aktivnim komponentama kojima se može prepisati utjecaj konzumiranja tih biljaka na prevenciju ili razvoj različitih bolesti. Mnoga znanstvena istraživanja pokazala su da primjena pripravaka nekih ljekovitih biljaka ima protuupalni i antireumatski učinak, uglavnom tako što interferiraju s posrednicima upale (Cameron, 2009). Osim toga, postoje biljke koje zahvaljujući učinku na mehanizam prijenosa boli imaju i analgetski učinak.

Od davnina se brojni pripravci od ljekovitog bilja u obliku čaja koriste za brojne neurološke smetnje. Pa je tako od davnina matičnjak poznat kao anksiolitik i biljka koja djeluje umirujuće, pa se preporučuje kod nervoze, nesanice, melankolije, depresije, migrena, neurotičnih smetnji srca, nervoze želuca, kod nadutosti i grčeva u želucu i crijevima, pomanjkanja apetita, osobito kod djece. Kadulja se još i kod starih Grka koristila kao biljka koja dobro djeluje na kognitivne sposobnosti (Kennedy, 2011). U narodnoj medicini

najpoznatije je liječenje desni i usne šupljine jakim uvarkom kadulje te grgljanje kod upaljenog grla. Izvrstan je lijek protiv prehlade, pomaže u liječenju bronhitisa, upale mokraćnog mjehura i žuči te djeluje protiv loše probave. Najčešće se koristi u obliku kaduljinog lista (*Salviae folium*) za pripremu čaja, te kao eterično ulje (Grdiša, 2015). Jedna od najpoznatijih biljaka koja se koristila u medicinske i aromaterapijske svrhe još u antičkim vremenima je i menta. Brojna istraživanja pokazuju kako esencijalna ulja i alkoholni ekstrakti mente imaju analgetičku aktivnost (Moreno i suradnici, 2002). Hlapivo ulje ublažava bolove na mjestu nanošenja ili posredno, preko refleksa na udaljenim dijelovima kože ili čak i drugim organima. Sam mentol na koži i sluznicama pobuđuje osjećaj hlađenja i djeluje blago anestetički (Toplak-Galle, 2005). Također se često esencijalna ulja i ekstrakti koriste u liječenju različitih virusnih i bakterijskih oboljenja (Biswas i sur., 2014., Civitelli i sur., 2014), a poznato je i antioksidacijsko djelovanje mente (Biswas i sur., 2014) te antitumorsko djelovanje (Amaral i sur., 2015). U kućanstvima se sve više koristi u ljekovite svrhe u obliku čaja ili eteričnog ulja za liječenje problema s dišnim putevima i probavnih smetnji. Kod želučanih tegoba, osobito kod povećanja količine želučane kiseline, grčevitih bolova želuca i crijeva, menta vrlo djelotvorno ublažava grčeve. Majčina dušica je vrlo omiljena u narodnoj medicini te se najčešće upotrebljava se u obliku čaja za ublažavanje kašlja i plućnih bolesti, napinjanje i crijevne tegobe. Srednjovjekovne knjige o ljekovitom bilju hvale majčinu dušicu kao »lijek za žene«, a narodna medicina preporučuje njen čaj za menstruacijske bolove. Osim toga, koristi se alkoholni ekstrakt, kao sredstvo za masažu kod reume i gihta. U narodnoj medicini lavanda se cijeni zbog umirujućeg djelovanja, pa tako jastučici od lavande nemirnoj dojenčadi donose miran san, a umiruju i majke. Radi ugodna mirisa i protiv moljaca, u ormare se stavljaju kitice lavande. Miris lavande ugodniji je i umiruje više od svih dodataka sredstvima za pranje i omekšivačima za rublje. Čaj od lavande i eterično ulje poboljšavaju probavu jer istjeruju plinove (karminativ) i potiču izlučivanje žuči. Tanini sprječavaju proljeve. (Toplak- Galle, 2005).

Oksidacijski stres

Tijekom metaboličkih procesa te kontakta sa vanjskim okolišnim čimbenicima u organizmu čovjeka stvara se veliki broj slobodnih radikala. Slobodni radikali su prema strukturi različiti oblici atoma ili molekule, odnosno spojevi kisika u kojima atom kisika u svojoj vanjskoj elektronskoj ljusci ima jedan nespareni elektron (Alibabić i Mujić, 2016). Nastali slobodni radikali su reaktivne kisikove vrste koje mogu imati važnu ulogu u metaboličkim procesima organizma ali u velikim koncentracijama mogu imati toksičan učinak na ljudski organizam. U malim količinama reaktivne kisikove vrste sudjeluju u staničnim odgovorima te imaju i

imunološku funkciju, dok pri visokim koncentracijama stvaraju oksidacijski stres koji uzrokuje oštećenje staničnih struktura (Genestra, 2007). Nastanak jednog slobodnog radikala može dovesti do lančane reakcije u proizvodnji drugih slobodnih radikala, a nastali slobodni radikali predstavljaju ozbiljnu opasnost za biološke makromolekule kao što su nukleinske kiseline, proteini, masne kiseline jer mogu uzrokovati oštećenja tih makromolekula ili čak uzrokovati i oštećenja gena. Slobodni radikali u ljudskom organizmu uzrokuju oksidacijski stres, promjenu redukcijske ravnoteže a posljedično tome uzrokuju i brojne kronične bolesti. Oksidacijski stres uzrokuje makromolekularna oštećenja te sudjeluje u razvoju brojnih bolesnih stanja kao što su ateroskleroza, dijabetes, rak, neurodegeneracija i starenje (Gupta i sur., 2014). Oksidacijski stres je pojam koji označuje neravnotežu između proizvodnje reaktivnih metabolita i obrambenog sustava organizma za njihovo uklanjanje (Halliwelland i Gutteridge, 2015). Narušen oksido-redukcijski status, koji uzrokuje proces lipidne peroksidacije, promjenu aktivnosti direktnih ili indirektnih antioksidativnih enzima, kao i smanjenje sadržaja neenzimskih antioksidanasa, može biti prepoznat u presimptomatskoj fazi brojnih bolesti. U tom smislu može biti pokazatelj izmijenjenih metaboličkih i funkcionalnih procesa (Đukić i sur., 2008).

Antioksidansi

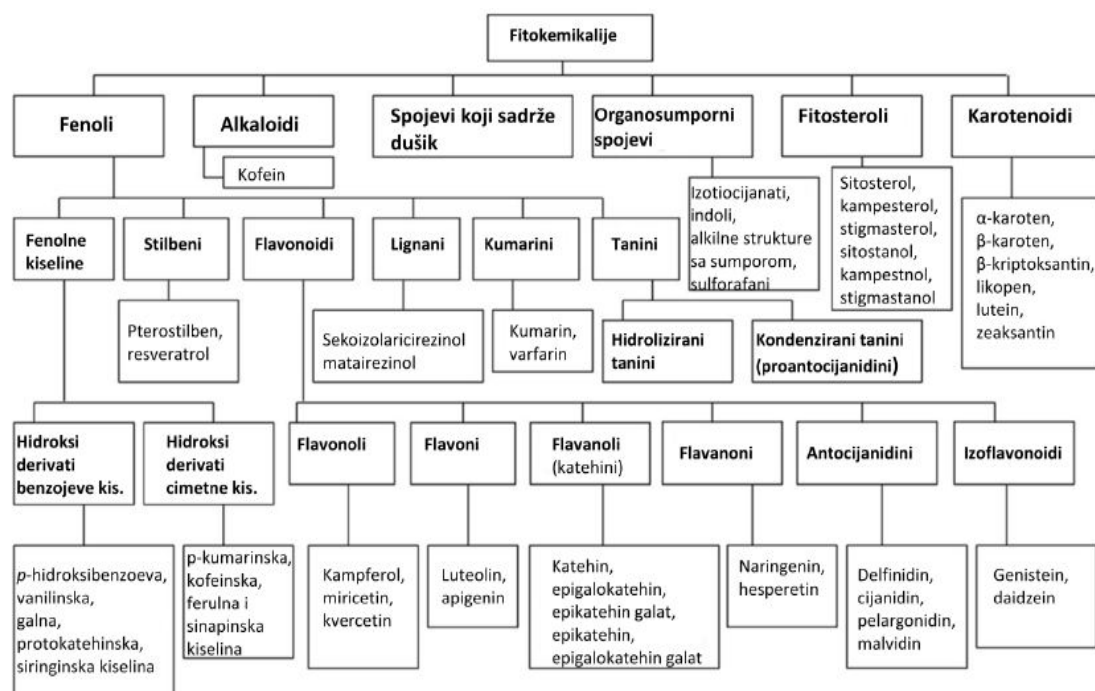
Organizam je razvio mehanizam protiv slobodnih radikala i brojne tvari u malim količinama i kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala, a takve tvari su antioksidansi (Alibabić i Mujić, 2016). U ljudskom organizmu za uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta razlikujemo one antioksidanse koji prirodno nastaju u našem organizmu (endogeni) i one koje unosimo hranom (egzogeni) (Gupta, 2014). Endogene antioksidanse možemo podijeliti na enzimске i neenzimске antioksidanse. Neki od enzimskih antioksidansa koji su direktno uključeni u proces neutralizacije reaktivnih kisikovih vrsta su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutationperoksidaza (GPx) i glutationreduktaza (GRx) (Halliwell, 2007). Neenzimski antioksidansi su podijeljeni na metaboličke koji nastaju u organizmu i na one koje unosimo hranom pripadaju (Gupta, 2014). Neki od metaboličkih neenzimskih antioksidanasa (nastaju u ljudskom organizmu) su glutation, lipoična kiselina, L-arginin, koenzima Q karotenoidi, koenzim Q10, melatonin, bilirubin, mokraćna kiselina, metalno kelirajući proteini, transferin itd. (Willcox i sur., 2004). Antioksidansi koje dobivamo iz hrane pripadaju egzogenim antioksidantima i njih nije moguće proizvesti u organizmu već ih je potrebno unositi hranom ili suplementima. Neki od tih antioksidanasa su vitamin E, vitamin C, karotenoidi, tragovi metala (selenij, magnezij, cink), flavonoidi, omega-3 i omega-6 masne kiseline itd. (Gupta, 2014). Nadalje, antioksidanse možemo podijeliti na primarne

antioksidanse koji inhibiraju ili usporavaju oksidaciju uklanjanjem slobodnih radikala te sekundarne antioksidanse koji djeluju mehanizmom koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala (Antolovich i sur., 2002). Antioksidansi u organizmu svoje djelovanje pokazuju kroz nekoliko različitih mehanizama: gašenje formiranih singlet kisika (npr. beta-karoten, retinol), uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (npr. polifenoli), uklanjanje ili smanjenje lipidnih slobodnih radikala (npr. alfa-tokoferol), uklanjanje prooksidacijskih metala (npr. polifenoli, flavonoidi), oksidirajući željezni ion (npr. ceruloplazmin, apoferitin), inhibiranje prooksidacijskih enzima (npr. alopurinol), induciranje ili pojačavanje djelovanja zaštitnih enzima u borbi protiv kisika i oksidansa (npr. butilirani hidroksianisol), štedeći ili obnavljajući intracelularne antioksidante (npr. askorbat, N-acetilcistein), stabilizirajući membrane protiv lipidne peroksidacije (npr. kolesterol, 17-beta-estradiol, tamoksifen), smanjenje oksidacijskog stresa stanica (npr. etanol, sorbitol, ksilitol), inhibiranje enzima koji posreduju ekspresiju gena koji su rezultat oksidativnog stresa (npr. tamoksifen, metoksibenzamid) (Čipak Gašparović i sur., 2010). Postoji i podjela na prirodne i sintetske antioksidanse. Prvi antioksidansi koji su se koristili za konzerviranje hrane bili su začini, prirodni antioksidansi koji su kasnije zamijenjeni sintetskim antioksidansima. U prirodne antioksidanse spadaju: tokoferoli, flavonoidi, fenolne kiseline, karotenoidi, askorbinska kiselina, a u novije vrijeme biljni ekstrakti nara, zelenog čaja, ružmarina, kadulje, origana, ekstrakt maslinovog lista i dr. Razne studije su pokazale da konzumiranje hrane bogate tzv. prirodnim antioksidansima doprinosi jačanju obrambenog sustava ljudskog organizma. Zato je pozornost usmjerena na razvoj i izolaciju prirodnih antioksidansa iz biljnih izvora. Skupina autora u Norveškoj FRAP metodom istražila je sadržaj antioksidansa u preko 3.000 namirnica koje su korištene diljem svijeta. Rezultat tih istraživanja pokazuje kako su antioksidativne komponente prosječno više sadržane u hrani biljnog podrijetla, a unutar kategorija, odnosno skupina namirnica, najviši udio antioksidativnih komponenata imaju ljekovito, začinsko i aromatično bilje, isključujući prehrambene dodatke koje se proizvode kako bismo dobili visok udio antioksidansa (Carlsen i sur., 2010).

Fitokemikalije

Važnu ulogu i djelovanje kod ljekovitog bilja možemo prepisati i određenim skupinama sastojaka ili pojedinim sastojcima (Parađiković, 2014). Rast i razvoj biljke, kao i njezin opstanak te komunikacije s okolinom regulirani su velikim brojem molekula sintetiziranih u biljci, poznatih pod nazivom biljni metaboliti. Biljni metaboliti dijele se u dvije skupine: na primarne i sekundarne metabolite (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Fitokemikalije ubrajamo u sekundarne biljne metabolite, To su bioaktivni nenutritivni spojevi u voću, povrću, cjelovitim

žitaricama i drugoj hrani biljnog podrijetla za koje se pretpostavlja da smanjuju rizik od kroničnih bolesti (Liu, 2004). Dosadašnje studije pokazuju kako fitokemikalije koje unosimo hranom mogu imati veliku ulogu u sprječavanju raznih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti te sprječavanju razvoja raka i napredovanju širenja stanica raka (Sun, 2002). Posebnu važnost u zaštiti zdravlja imaju zbog svog antioksidativnog djelovanja i sposobnosti da doniraju elektron ili vodik slobodnim radikalima. Na taj način mogu utjecati na ekspresiju gena u stanicama koje se dijele, diobu stanica, djelovati na gene supresora tumora, inducirati zaustavljanje stanične diobe i apoptozu, modulirati enzimsku aktivnost u detoksikaciji, djelovati na procese oksidacije i redukcije, stimulirati imunološki sustav te također imati antibakterijski i antivirusni učinak (Venugopal, 2012). Osim antioksidativnog djelovanja, ostvaruju farmakološki učinak međudjelovanjem sa signalnim molekulama, transkripcijskim čimbenicima i genima, ponašajući se kao regulatori unutarstaničnih procesa (Domitrović, 2012). Fitokemikalije mogu imati i svoju ulogu u liječenju pretilosti zbog mogućeg utjecaja na supresiju rasta stanica adipoznog tkiva, inhibicije diferencijacije preadipocita, stimulacije lipolize i indukcije apoptoze postojećih adipocita, čime se smanjuje masa masnog tkiva (Mohamed i sur., 2014). Najvažnije skupine fitokemikalija se mogu podijeliti u opće kategorije, koje su prikazane na slici 9., a to su: karotenoidi, fenoli, alkaloidi, spojevi koji sadrže dušik, organosumporni spojevi (Liu, 2004).



Slika 9. Podjela fitokemikalija (Liu, 2004)

Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji se pojavljuju u gotovo svim dijelovima velikog broja vaskularnih biljaka te je danas poznato više od 8000 različitih fenolnih spojeva (Tsao, 2010). Kemijski gledano fenolni spojevi su spojevi kojima je hidroksilna skupina (OH) direktno vezana na benzenski ili aromatski prsten, a obuhvaćaju spojeve kao što su: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, kumarini i tanini (Liu, 2004). Iako se fenolni spojevi najčešće spominju kao spojevi s fenolnim prstenom oni su zapravo veoma raznolika skupina sekundarnih metabolita zbog čega su u literaturi prisutni mnogi načini njihove klasifikacije: prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl. (Tsao, 2010). Kao bioaktivni biljni produkti imaju važnu ulogu u biljkama, pa su tako odgovorni za boju, okus i aromu biljke, također pružaju potporu i zaštitu tkiva, a mogu sudjelovati različitim metaboličkim procesima kao signalne molekule (Boudet, 2007). Voće, povrće, cjelovite žitarice te druga vrsta hrane kao što su čokolada, vino, čajevi i ljekovito bilje dobar su izvor fenolnih spojeva. Posljednjih nekoliko godina sve se veća pozornost posvećuje fenolnim spojevima i njihovim konzumiranjem u prehrani ljudi te povoljnim utjecajem na zdravlje. Razlog tome je njihova antioksidativna aktivnost zahvaljujući kojem pokazuju raznovrsne biološke učinke na zdravlje, te stoga ovi spojevi mogu imati zaštitni učinak od razvoja raznih karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. (Boudet, 2007). Fenolni spojevi kao antioksidansi koje nalazimo u hrani mogu spriječiti oksidaciju spojeva podložnih oksidaciji, doniranjem elektrona ili vodikova atoma, čime u biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala (oksidansa). Antioksidansi inaktiviraju djelovanje slobodnih radikala i sprječavaju njihovo štetno djelovanje. Na sastav i količinu fenolnih spojeva u biljkama imaju utjecaja uvjeti u okolišu: svjetlost, temperatura, agrotehničke mjere te uvjeti skladištenja i obrade. Količine nekih fenola se mogu povećati u uvjetima stresa, povećanog UV zračenja, patogenih stanja, oštećenja, zagađenja zraka i u ekstremnim uvjetima (Zobel, 1997).

Fenolni spojevi kao dodaci prehrani

Dodatak prehrani je svaki proizvod koji je namijenjen nadopuni prehrane a sadrži jednu od slijedećih komponenti - vitamine, minerale, bilje ili ljekovito bilje, njihove koncentrate ili ekstrakte ili pak njihove smjese.¹ Upotrebom dodataka prehrani se poboljšava se otpornost

¹ Definicija prema (Dietary Health and Education Act objavljen 1994 god) koju je izdao Nacionalni institut za zdravlje SAD (National Institute of Health) tj. njihov ured za suplemente (Office of Dietary Supplements)

organizma na stresne vanjske uvjete i pomaže u održavanju pravilnih fizioloških funkcija organizma. Dodaci prehrani (suplementi) se prezentiraju tržištu kao meke ili tvrde kapsule, prašci, tablete, kapi, čajevi, tekućine i u drugim oblicima i mogu se pakirati posebno ili dodavati konvencionalnoj hrani (Jašić, 2010).

Ekstrahirani fenolni spojevi iz ljekovitog bilja su već dugo u upotrebi kao prehrambeni aditivi, poboljšivači okusa, mirisa i boje te kao antioksidansi (Alu'Datt, 2015). Također sve češće svoju primjenu nalaze na tržištu kao dodaci prehrani zbog svojih dobrobiti na zdravlje. Međutim teško ih je uključiti u prehranu zbog njihovih loših karakteristika topljivosti, kemijske nestabilnosti te niske biološke raspoloživosti. Ovaj se problem može riješiti inkapsuliranjem bioaktivnih komponenata kao nanočestice. Biološka raspoloživost izvedbe zatvorenih bioaktivnih tvari često se povećava kada se veličina čestica koje ih sadrže smanjuje, zbog brže probave, mogućnosti penetriranja u mukoznu sluznicu ili zbog direktnog unosa od strane stanica. Nanočestice mogu preživjeti prolaz kroz specifične regije probavnog trakta, a zatim otpustiti bioktivne tvari na određenom mjestu, čime se povećava njihova potencijalna zdravstvena dobrobit (Jafari, 2017).

O drogama

Droge su osušene biljke ili dijelovi biljaka, koje određeno vrijeme možemo čuvati za kasniju preradu i uporabu. Sastojci i aktivne tvari mogu biti ravnomjerno raspoređene po cijeloj biljci, a mogu biti i nagomilani u određenim dijelovima biljke. Mogu se upotrebljavati u farmaceutskoj, kozmetičkoj ili prehrambenoj industriji. Od njih najčešće pravimo različite pripravke. Određeni sastojci u gotovu pripravku koncentrirani su s obzirom na spravljanje i vrstu upotrebljena otapala (Toplak-Galle, 2005). Najčešći pripravi su: čaj, tekući ekstrakt, infuzije, tinkture, destilati. Svi pripravci su standardizirani, tj. dobivaju se od određene količine bilja koje je ubrani u odgovarajuće vrijeme, osušeno i čuvano na predviđeni način. Nadalje, u pripravcima se mora nalaziti odgovarajuća koncentracija djelatnih tvari, čije određivanje podliježe standardnoj analizi (Križanić, 2005).

Čaj

Najčešći pripravak od ljekovitog bilja je čaj koji se priprema na više načina, ovisno o dijelu biljke koji se koristi, aktivnim tvarima koje biljka sadrži i učincima koje čajem želimo postići. Tako čaj može biti pripravljen kao oparak, uvarak, provarak i naljev. Čajeve uglavnom spravljamo kao oparak (infuz). Ako nema drugih uputa, dvije čajne žličice suhe biljke prelijemo sa 200 ml vrele vode, promiješamo i ostavimo da pokriveno odstoji deset minuta. Zajedno s vodenom parom u zrak isparavaju i hlapiva ulja. Kad je posuda pokrivena, vodena

para i hlapivo ulje na poklopcu se kondenziraju i kapaju natrag u čaj. Time čuvamo veću količinu aktivnih tvari u čaju.

Za uvarak ili dekokt čajnu žlicu suhe biljke stavimo u 2,5 dl hladne vode, promiješamo, lagano zagrijemo do vrenja, maknemo s vatre i ostavimo poklopljeno još desetak minuta. Na ovaj način pripravljamo čajeve od biljaka iz kojih se aktivne tvari teže ekstrahiraju.

Provarak koristimo za pripravljanje čaja od biljaka koje sadrže termostabilne tvari (npr. saponini) ili kod kojih se ljekovite tvari teško ekstrahiraju (korijen, kora). 1-2 čajne žlice stavimo u 2,5 dl hladne vode i kuhamo na laganoj vatri 10-15 min. ili prema uputi.

Naljev je način pripreme koji se koristi kod biljaka koje sadrže sluzi ili neke druge sastojke osjetljive na toplinu. Dvije čajne žlice droge prelijemo hladnom vodom, promiješamo i ostavimo poklopljeno oko 6 sati (Toplak-Galle, 2001).

Ekstrakti

Pod biljnim ekstraktima podrazumijevaju se koncentrirani pripravci osušenog biljnog materijala (Grünwald i Jänicke, 2006) a dobivaju se postupkom ekstrakcije. Ekstrakcija je tehnološka operacija kojom se iz droga biljnog i životinjskog porijekla ekstrahiraju, odnosno izdvajaju aktivne komponente pomoću određenog otapala. Upotrebjeno otapalo se nakon ekstrakcije, potpuno ili djelomično odstrani. Ekstrakti mogu biti tekući, praškasti ili granulirani. Danas se teži da svi ekstrakti budu standardizirane i kontrolirane kvalitete. Uz ujednačenu kvalitetu droge, opremu i ustaljen način izvođenja procesa ekstrakcije trebalo bi dobivati i ekstrakte standardne kvalitete (Radojković, 2012). Prije ekstrahiranja biljke se obično usitnjuju, a katkad je potrebna inaktivacija enzima koji su odgovorni za određene postupke u biljci ili odmašćivanje droge (Grünwald i Jänicke, 2006).

Usitnjenost biljnog materijala pri pripremi pripravka

Kako se za ekstrakciju najčešće koriste droge, a rijetko svježi biljni dijelovi, izdvajanje aktivnih supstanci iz droge, uvjetovano je anatomskim podrijetlom droge. Za uspješnu ekstrakciju aktivnih supstanci iz kore, korijena, plodova i sjemenki glavni vrlo je bitan faktor usitnjenosti polaznog materijala. Usitnjavanjem se povećava specifična površina materijala, a time i mogućnost kontakta pojedinih čestica sa otapalom za ekstrakciju (Radojković, 2012).

Blisko infracrvena spektroskopija - NIR

Blisko infracrvena spektroskopija (NIR) u posljednjih nekoliko godina zauzima značajno mjesto među ostalim spektroskopskim metodama koje koriste kao mjerni signal elektromagnetsko zračenje materijala. Obuhvaća malo područje elektromagnetskog spektra

od 780 do 2500 nm ili od 4000 cm^{-1} do 12 500 cm^{-1} (Ozaki i sur. 2007). To je nedestruktivna metoda koja pokazuje dobre mogućnosti za određivanje kemijskih i fizikalnih svojstava hrane i prehrambenih proizvoda. Zbog osjetljivosti na CH, NH i OH apsorpciju komponenata hrane, brzinu odgovora, jednostavnu pripremu uzorka i činjenice da je metoda nedestruktivna te da je cijena instrumenata i opreme niske, ova metoda se sve češće koristi u istraživanjima i analizama u znanosti o prehrani i prehrambenoj tehnologiji (Ozaki i sur., 2007). Ova tehnika omogućava praćenje fizikalnih i kemijskih procesa *in situ*. Takav pristup ima mnogo prednosti, od kojih treba spomenuti manje izlaganje opasnim materijalima, snimanje u realnom vremenu te manju mogućnost kontaminacije ili uništavanja uzorka (Findlay, 1998). NIR spektroskopija se uspješno primjenjuje za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Ciljevi kvalitativne multivarijantne analize su identifikacija sastojaka u uzorku, utvrđivanje razlika između pojedinih uzoraka te njihovo grupiranje. Postupak identifikacije uključuje klasifikaciju sastojaka prema vrijednostima mjerenih varijabli. U kvantitativnoj analizi, u kombinaciji s multivarijantnim metodama analize podataka, ova tehnika se može primijeniti za klasifikaciju uzoraka prema količini djelatne tvari (Jednačak i Novak, 2013).

NIR spektroskopija *in-line* se vrlo uspješno primjenjuje za praćenje i kontrolu različitih biljnih ekstrakata. Postoji u nekoliko izvedbi, od kojih se najviše primjenjuje transmisijska NIR spektroskopija *in-line*. Mjeri se intenzitet elektromagnetskog zračenja sa površine mjerenog objekta na dvije ili više posebno odabranih valnih dužina. Navedenom tehnikom moguće je pratiti procese u realnom vremenu, pomoću sonde koja je optičkim vlaknima povezana sa spektrometrom (Jednačak i Novak, 2013). Infracrveno zračenje iz izvora prenosi se optičkim vlaknom do sustava leća te usmjerava prema uzorku gdje dolazi do njegove djelomične apsorpcije. Propušteno zračenje se zatim pomoću optičkog vlakna prenosi natrag do detektora. Safirni prozori i obloga od kemijski inertnog metala štite sondu od vanjskih utjecaja tijekom mjerenja u realnim uvjetima.

Kemometrija

NIR spektroskopija se temelji na elektromagnetskom zračenju u bliskom infracrvenom području ali analiza spektra se vrši uz pomoć različitih kemometrijskih tehnika, kao što su multi linearna regresijska analiza, MLRA, analiza glavnih komponenti, PCA i kanonska analiza varijabli, CVA (Ding i Xu, 1999; Alishahi i sur., 2010). Metode multivarijantne analize podataka su kemometrijske metode koje se primjenjuju za dobivanje informacija iz kemijskih podataka pomoću statističkih postupaka. U kombinaciji s metodama *in-line* kao što je NIR spektroskopija omogućavaju bolje razumijevanje fizičkih i kemijskih procesa te dobivanje proizvoda s optimalnim svojstvima (Jednačak i Novak, 2013).

Analiza glavnih komponenti (PCA)

Metoda PCA omogućava kvalitativnu analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Koristi se i za brzu procjenu strukture podataka prije detaljne analize ili kvantifikacije fizičkog ili kemijskog procesa (Jednačak, 2013). Specifični su ciljevi analize glavnih komponenti dobivanje glavnih obrazaca odnosa između promatranih varijabli, svođenje velikog broja promatranih varijabli na manji broj faktora, dobivanje operacijske definicije (regresijske jednadžbe) za temeljni proces uporabom promatranih varijabli ili testiranje hipoteze o prirodi temeljnih procesa. Analiza glavnih komponenti od značajne je koristi jer svodi brojne varijable na nekoliko faktora. Matematički gledano, ove analize daju nekoliko linearnih kombinacija promatranih varijabli, od kojih je svaka linearna kombinacija faktor. Faktori sumiraju obrasce korelacija u promatranoj korelacijskoj matrici i mogu se, s različitim stupnjevima uspjeha, koristiti za reprodukciju promatrane korelacijske matrice (Rajačić, 2015). Ova metoda temelji se na određivanju korelacija između pojedinih varijabli pri čemu grupira uzorke u glavne komponente i opisuje odnos između pojedinih varijabli te omogućuje vizualizaciju njihovog odnosa, tj. da li su one slične ili različite. Objekti koji su slični jedan drugome grupirat će se zajedno, dok će oni različiti biti udaljeniji.

MATERIJALI I METODE

Materijali:

Biljke:

U ovom radu kao ljekovite biljne vrste za ispitivanje usitnjenosti NIR analizom korišteni su dijelovi biljnih vrsta kadulje (*Salvia officinalis* L.), majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.), lavande (*Lavandula x hybrida* L.), matičnjaka (*Melissa officinalis* L.), mente (*Mentha piperita* L.). Dijelovi ovih biljaka kupljeni su u osušenom obliku od proizvođača ljekovitih biljnih čajeva (Suban d.o.o.).

Uređaji i software:

- mlin: Ika Tube Mill.
- laboratorijska tresilica Analysette 3 Pro (Fritsch, Njemačka)
- NIR-128-1.7-USB/6.25/50µm skenirajući monokromator Control Development, Inc.
- STATISTICA v. 10 (StatSoft Inc., USA)

Metode rada

Usitnjavanje

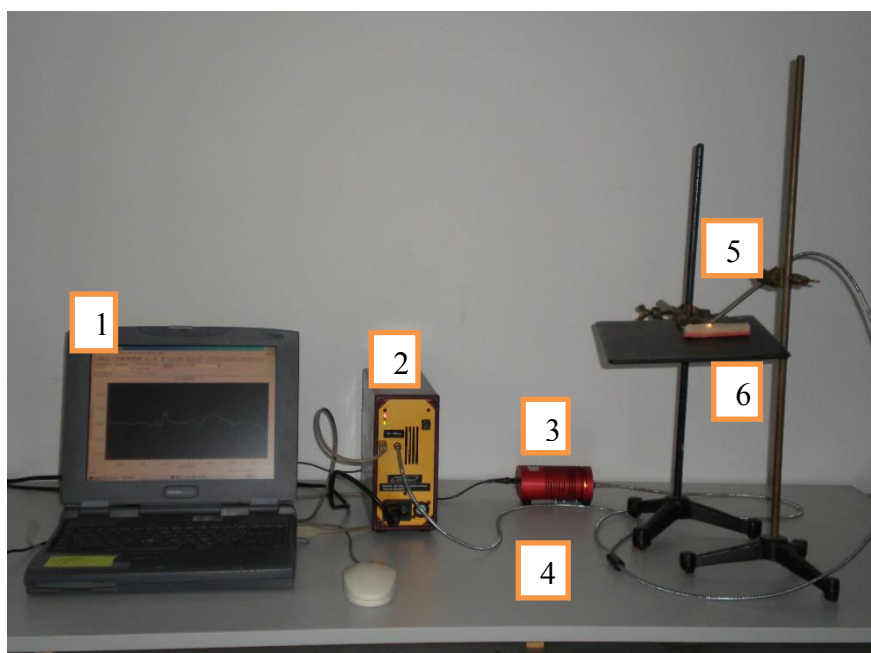
Da bi se dobile različite frakcije veličine čestica zeleni ovih biljaka, provodi se mljevenje upotrebom mlina pri brzini okretaja oštice 15000 rpm. Vrijeme mljevenja se prilagođava u skladu sa veličinom čestica koje se želi dobiti ($t=10-40$ s).

Prosijavanje

Nakon usitnjavanja slijedi prosijavanje. Prosijavanje se provodi upotrebom standardiziranih DIN sita (Fritsch, Njemačka) promjera pora 1000, 800, 500, 355, 250 i 100 µm. Sita se poslažu na laboratorijsku tresilicu Analysette 3 Pro (Fritsch, Njemačka) te se provodi tresenje u trajanju 10 minuta u intervalima od 3 sekunde i amplitudom od 2,5 mm. Nakon prosijavanja frakcije se maknu sa sita i svaka se pakira u zasebnu ambalažu.

NIR analiza

Za snimanje NIR spektra (područje između 904 nm do 1699 nm) ljekovitog bilja različite veličine korištena je oprema koja je uključivala: laptop, NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m skenirajući monokromator Control Development, Inc., opremljen sa Spec32 softverom, polikromatski izvor svjetla, optički kablovi i hemisferna posudica u koju se stavlja uzorak (prikazano na slici 10). Nije potrebna nikakva mehanička ili kemijska obrada uzoraka koji se koristi za mjerenje. Za svaku određenu frakciju uzorka (1000, 800, 500, 355, 250 i <100 μ m), napravljeno je pet mjerenja.



Slika 10. NIR instrument povezan sa laptopom

(1) Laptop sa Spec32 programom, (2) NIR instrument, (3) izvor svjetla, (4) optički kabel, (5) mjerenje, (6) uzorak

NIR spektri zabilježeni su u EXCEL formatu i u takvom formatu su iskorišteni za obradu podataka u STATISTICA v. 10 (StatSoft Inc., USA) programu.

Statistička analiza glavnih komponentata (PCA metoda)

Analiza glavnih komponenti (PCA) korištena je za prepoznavanje obrazaca u podacima i prikazivanju podataka na način da se ističu njihove sličnosti i razlike. Njezin je cilj izvući važne podatke iz snimljenih spektara i izraziti te informacije kao skup novih ortogonalnih varijabli nazvanih glavnim komponentama ili čimbenicima. PCA također predstavlja uzorak sličnosti promatranja i varijabli tako što ih prikazuje kao točke na dijagramu (Saporta i

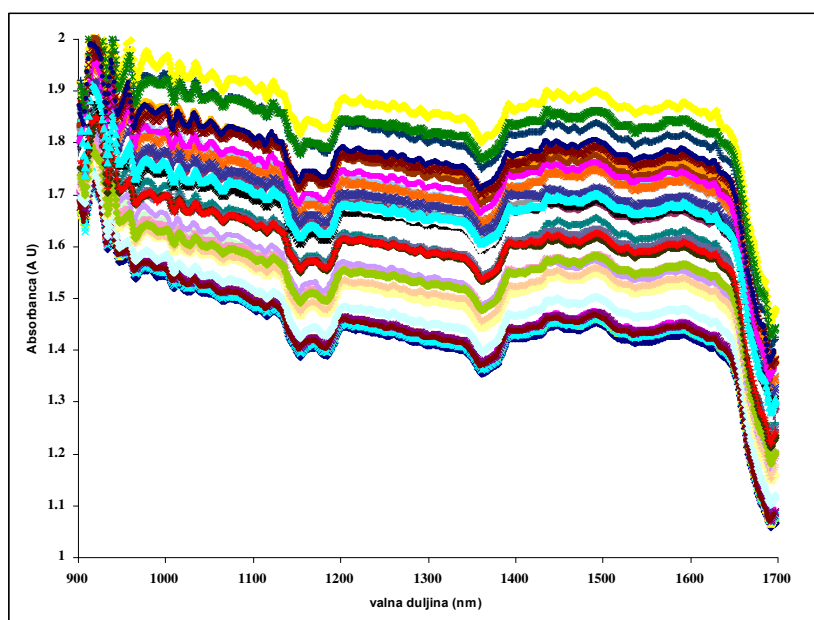
Niang, 2010). Snimljeni neobrađeni spektri u EXCEL formatu korišteni su za izradu analize glavnih komponenata pomoću statističkog programa Statistica v. 10 (StatSoft Inc., USA).

Mikroskopiranje

Kako bi dokazali da pojedine frakcije ljekovitog bilja NIR nije uspio razlikovati zbog prisutnosti većih čestica u manjim frakcijama, napravili smo mikroskopske slike. Uzorci su pregledani BTC tip LCD-35 (Bresser, Rhede, Germany) mikroskopom na povećanju 40X i uslikani su integriranom mikroskopskom kamerom.

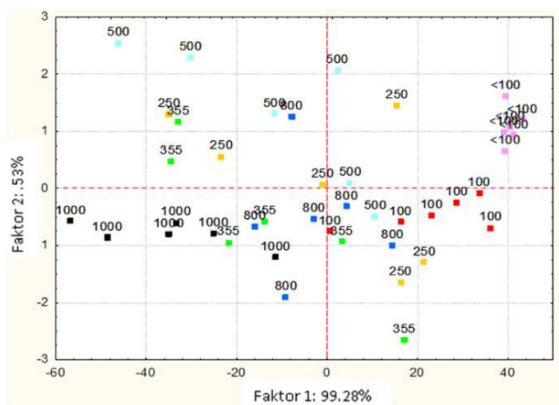
Rezultati i rasprava

Upotrebom NIR instrumenta za svaku veličinu čestica (<100 μm , 100 μm , 250 μm , 355 μm , 500 μm , 800 μm i 1000 μm) napravljeno je 5 snimaka spektara, odnosno 35 snimaka za svaku ljekovitu biljku (kadulja, lavanda, matičnjak, majčina dušica, menta), što ukupno iznosi 175 spektara. Svi spektri su digitalno snimljeni kao EXCEL datoteke radi kasnije analize podataka. Primjer spektara različitih veličina čestica za jednu ljekovitu biljku (lavandu) prikazan je na slici 11.

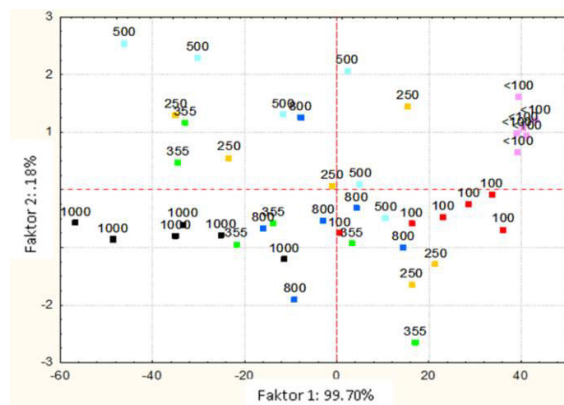


Slika 11. NIR spektri različitih veličina čestica (<100 μm , 100 μm , 250 μm , 355 μm , 500 μm , 800 μm i 1000 μm) lavande

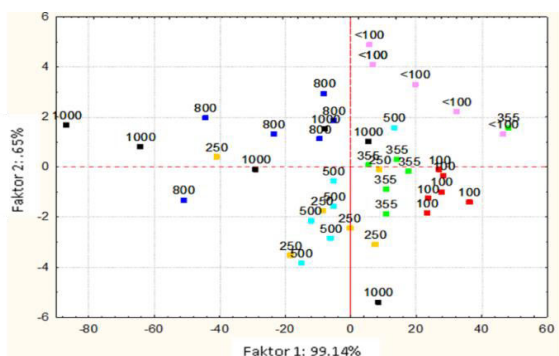
Koristeći kemometrijsku metodu analize glavnih komponenta (PCA) napravljene su analize svih veličina čestica za svaku pojedinu biljku. Na slikama 12, 13, 14, 15 i 16 prikazani su primjeri analize glavnih komponenta prikazane kao omjer prva dva faktora za frakcije svih veličina biljka.



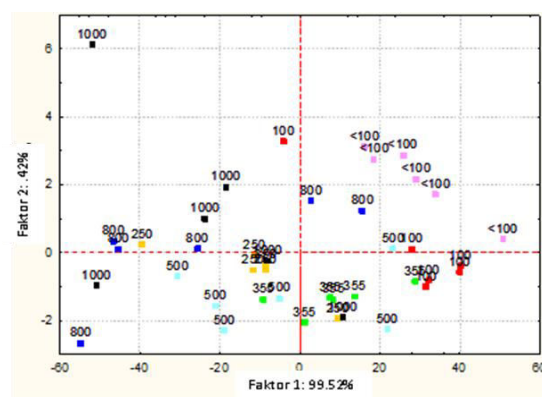
Slika 12. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije svih veličina biljke kadulje



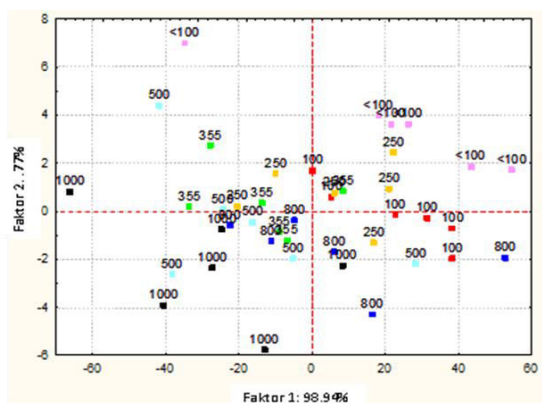
Slika 13. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije svih veličina biljke lavande



Slika 14. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije svih veličina biljke matičnjaka

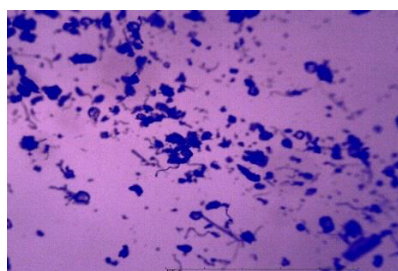


Slika 15. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije svih veličina biljke majčine dušice



Slika 16. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije svih veličina biljke mente

Slike (12, 13, 14, 15 i 16) pokazuju kako NIR može razlikovati frakcije različitih veličina istih biljaka kod nekih biljaka uspješnije (matičnjak i majčina dušica i menta) dok kod nekih biljaka (lavanda i kadulja) manje uspješno. Slični rezultati dobiveni su i u radu Valinger i sur., 2016. u kojem je također ispitivana raspodjela različitih veličina čestica osušenih ljekovitih biljaka (maslačak, kamilica, neven, trputac i stolisnik) i rezultati su pokazali uniformnu raspodjelu veličine čestica za vrlo sitne čestice dok je za veće čestice mikroskopskom analizom dokazano prisustvo čestica dvije do tri različite veličine. Iz tog razloga u ovom radu su napravljene mikroskopske slike pojedinih veličina čestica i na primjeru lavande (slika 17A) i kadulje (slika 17B) također je vidljiva prisutnost većih i manjih čestica od 800 μm . Ukoliko je raspodjela veličine čestica uniformna pomoću NIR spektroskopije moguće je potpuno odvojiti frakcije različitih veličina čestica što je također prikazano u spomenutom radu jer zbog osjetljivosti uređaja ukoliko postoji samo par čestica različite veličine unutar određene frakcije NIR će uspješno izdvojiti taj uzorak kao zaseban čime se i pokazuje njegova korist u primjeni kontrole kvalitete i patvorenosti prehrambenih proizvoda (Ružičkova i Šustova, 2006).



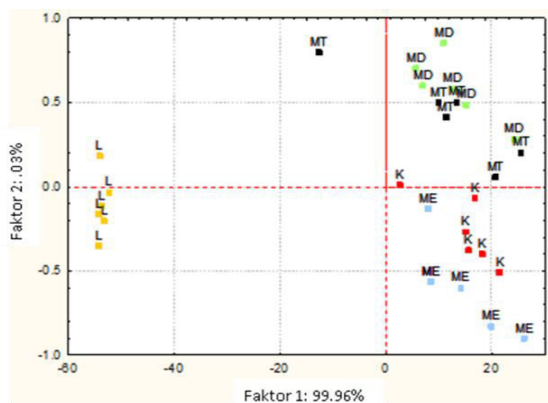
A



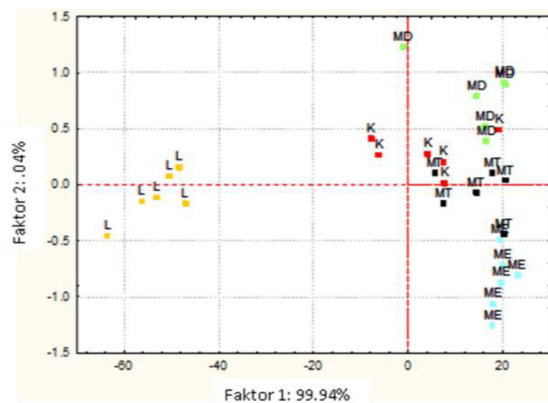
B

Slika 17. Mikroskopska slika čestica lavande (17A) i kadulje (17B) veličine 800 μm .

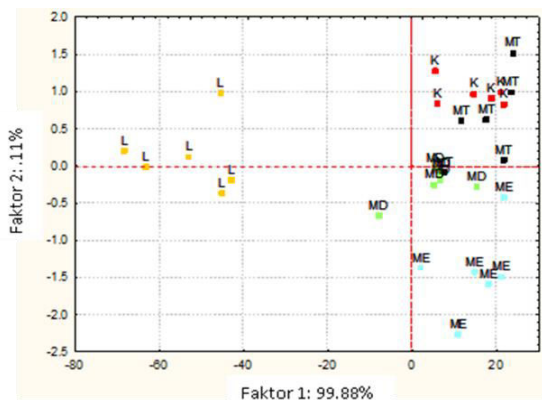
Kako bi se vidjelo da je NIR spektroskopija vrlo poželjna u razlikovanju istih veličina čestica različitih biljaka napravljena je analiza za svaku veličinu čestica (<100 μm , 100 μm , 250 μm , 355 μm , 500 μm , 800 μm i 1000 μm) svih 5 biljaka i rezultati su prikazani na Slikama 18, 19, 20, 21, 22, 23 i 24.



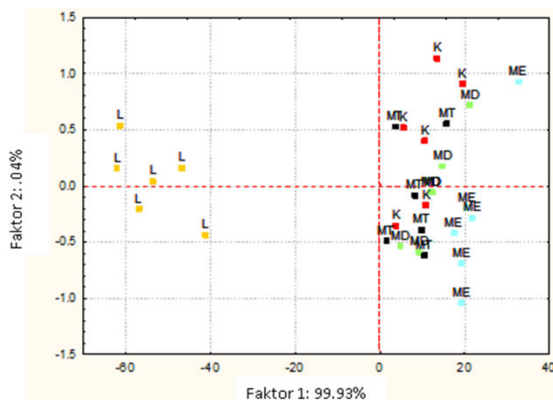
Slika 18. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije veličine čestica manjih od 100 μm pet ljekovitih biljaka (K - kadulja, L - lavanda, MD - majčina dušica, ME – melisa, MT – menta)



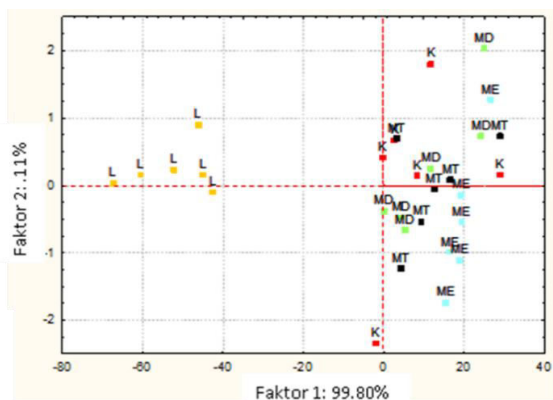
Slika 19. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije veličine čestica 100 μm pet ljekovitih biljaka (K - kadulja, L - lavanda, MD - majčina dušica, ME – melisa, MT – menta)



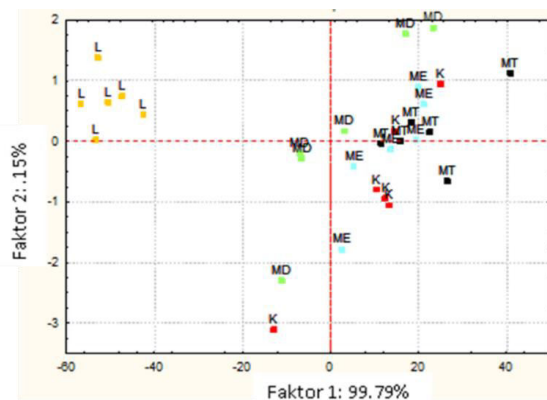
Slika 20. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije veličine čestica 250 μm pet ljekovitih biljaka (K - kadulja, L - lavanda, MD - majčina dušica, ME – melisa, MT – menta)



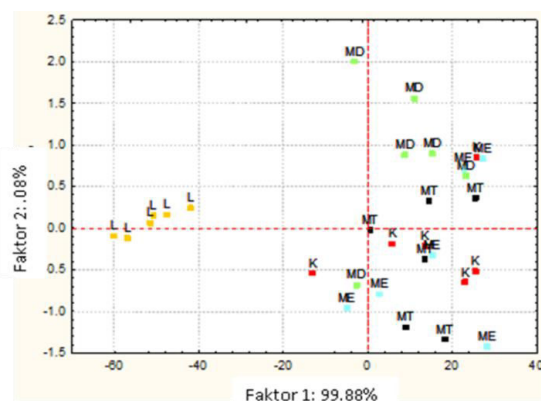
Slika 21. Analiza glavnih komponentata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije veličine čestica 355 μm pet ljekovitih biljaka (K - kadulja, L - lavanda, MD - majčina dušica, ME – melisa, MT – menta)



Slika 22. Analiza glavnih komponenata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije veličine čestica 500 µm pet ljekovitih biljaka (K - kadulja, L - lavanda, MD - majčina dušica, ME – melisa, MT – menta)



Slika 23. Analiza glavnih komponenata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije veličine čestica 800 µm pet ljekovitih biljaka (K - kadulja, L - lavanda, MD - majčina dušica, ME – melisa, MT – menta)

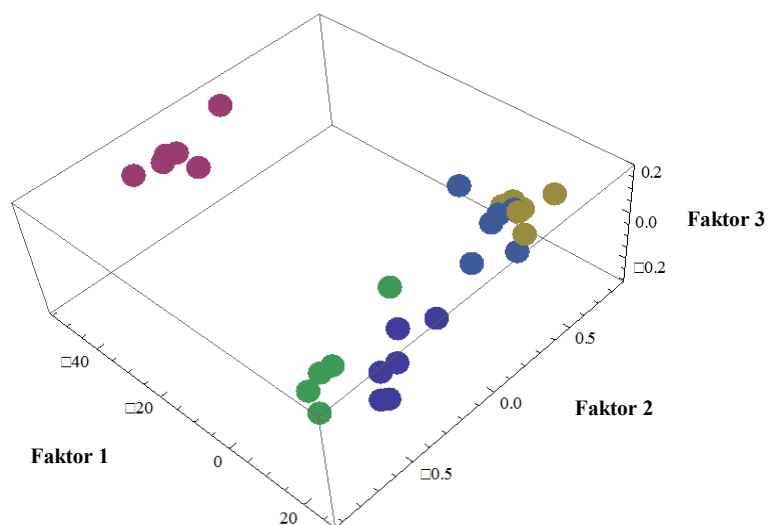


Slika 24. Analiza glavnih komponenata prikazana kao omjer prva dva faktora za frakcije veličine čestica većih od 1000 µm pet ljekovitih biljaka (K - kadulja, L - lavanda, MD - majčina dušica, ME – melisa, MT – menta)

Na temelju slika 18, 19, 20, 21, 22, 23 i 24 vidljivo je da za pojedinu veličinu čestica NIR spektroskopija pomoću analize glavnih komponenata razlikuje različite biljke istih veličina čestica. Posebno je zanimljiva lavanda koja je u svim slučajevima dosta izdvojena od ostalih biljaka što bi se moglo pripisati određenim fizikalno-kemijskim svojstvima koja bi trebalo još istražiti.

Primjenom PCA analize i usporedbom omjera prva dva faktora može se dogoditi da dođe do preklapanja uzoraka i tu svrhu u novije vrijeme koristi se trodimenzionalni prikaz kako bi se

uključio i treći faktor te u prostoru vidjelo da iako u dvije dimenzije dolazi do preklapanja, u tri dimenzije ipak ne postoji preklapanje jer su podaci grupirani jedni ispod drugih. Jedan primjer trodimenzionalne PCA analize prikazan je za istu veličinu čestica ($<100\text{ }\mu\text{m}$) svih pet biljaka prikazan je na slici 25.



Slika 25. 3D prikaz veličine čestica manjih od $100\text{ }\mu\text{m}$ pet ljekovitih biljaka (● - kadulja, ● - lavanda, ● - majčina dušica, ● – melisa, ● – menta)

Zaključak

1. NIR spektroskopija predstavlja analitičku tehniku koja uživa sve veću popularnost u prehrambenoj industriji zbog svojih niskih troškova rada, te ne zahtijeva prethodni tretman uzorka.
2. Snimanje NIR instrumentom zahtijeva vrlo kratko vrijeme ukoliko se snimaju pojedini uzorci i ne dolazi do narušavanja strukture i svojstava mjerenih uzoraka, a također postoji i mogućnost kontinuiranog mjerenja.
3. Za uspješnu ekstrakciju aktivnih supstanci iz kore, korijena, plodova i sjemenki vrlo je bitan faktor usitnjenosti polaznog materijala koji je istraživao u ovom radu.
4. Za uzorke iste usitnjenosti različitih biljaka dobiveni rezultati upućuju na mogućnost praćenja usitnjenosti različitih biljaka koja bi se mogla primijeniti u proizvodnom procesu.
5. Zbog visoke osjetljivosti NIR spektroskopije što je vidljivo na uzorcima iste usitnjenosti pojedine ljekovite biljke moguće je otkriti postoji li u tim uzorcima više različitih veličina čestica ili se radi o homogenoj smjesi.
6. Iako obrada podataka zahtijeva poznavanje kemometrije kalibrirani sustav se može koristiti kao kontinuirani bez potrebne dodatne obrade podataka (primjer je u prehrambenoj industriji mjerenje vlage uzoraka na pokretnoj traci).
7. Redovno ili linijsko mjerenje usitnjenosti ljekovitog bilja NIR spektroskopijom može biti jedan od načina za kontrolu kvalitete određenih proizvoda u kojima se kao sirovina za njihovu proizvodnju koristi ljekovito bilje te također i prilikom razvoja novih prehrambenih proizvoda.

Popis literature

- Alibabić V., Mujić I. (2016) Pravila prehrana i zdravlje. Veleučilište u Rijeci, Rijeka. Str. 185-186.
- Alishahia A., Farahmanda H., Prietob N., Cozzolino D. (2010) A review: Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta A* **75**: 1–7.
- Alu'Datt M. H., Rababah T., Alhamad M. N., Ereifej K., Al-Mahasneh M., Brewer S., Rawshdeh M. (2015) Optimization extraction conditions for phenolic compounds, antioxidant and inhibitory activities of angiotensin i-converting enzyme (ace), α -glucosidase and α -amylase from *Mentha spicata* L. *Journal of Food Biochemistry* **40**: 335–344.
- Amaral R. G., Fonseca C. S., Silva T. K. M., Andrade L. N., Franca M. E., Barbosa-Filho J. M., de Sousa D. P., Moraes M. O., Pessoa C. Ó., Carvalho A. A. and Thomazzi S. M. (2015) Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **67**(8): 1100-1106.
- Anderson L. J., Jacob M. V. (2010) Effect of RF power on the optical and morphological properties of RF plasma polymerised linalyl acetate thin films. *Applied Surface Science* **256**: 3293–3298.
- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**: 183–198.
- Argyropoulos D. (2015) Menthol NMR analyst Sample Application. <<http://www.sciencesoft.net/menthol/>> Pristupljeno 5. srpnja 2017.
- Balić Svalina Š. (2017) Majčinom dušicom protiv bronhitisa i upale grla. <<http://www.adiva.hr/majcinom-dusicom-protiv-bronhitisa-i-upale-grla.aspx>> Pristupljeno: 5. srpnja 2017.
- Baliga M. S., Rao S. (2010) Radioprotective potential of mint: A brief review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* **6**: 255-62.
- Biswas N. N., Saha S. i Ali M. K. (2014) Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of *Mentha arvensis* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **4**(10): 792-797.
- Boudet A.-M. (2007) Review: Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **68**: 2722–2735.
- Brezovec N., Carović K., Kolak I., Britvec M., Šatović Z. (2006) Opis i procjena svojstava primki ljekovitog matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) hrvatske banke biljnih gena. *Sjemenarstvo* **23**: 57-66.
- Cameron M., Gagnier J. J., Little C. V., Parsons T. J., Blümle A., Chrubasik S. (2009)

Evidence of effectiveness of herbal medicinal products in the treatment of arthritis. Part 2: Rheumatoid arthritis. *Phytotherapy Research* **23**: 1647–1662.

Carlsen M. H., Bente C., Halvorsen L., Holte K., Siv K., Steinar B. D., Sampson L., Willey C., Senoo H., Umezono Y., Sanada C., Barikmo I., Berhe N., Willett W. C., Phillips K. M., Jacobs D. R., Jr Blomhoff, R. (2010) The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal* **9**: 3.

Civitelli L., Panella S., Marcocci M. E., De Petris A., Garzoli S., Pepi F., Vavala E., Ragno R., Nencioni L., Palamara AT., Angiolella L. (2014) In vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperite none oxide. *Phytomedicine* **2**(6): 857-965.

Cozzolino D., Roberts J. (2016) Applications and developments on the use of vibrational spectroscopy imaging for the analysis, monitoring and characterisation of crops and plants. *Rewiev. Molecules* **21**(6): 755.

Cravotto G., Boffa L., Genzini L., Garella D. (2010) Phytotherapeutics: An evaluation of the potential of 1000 plants. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **35**: 11-48.

Čipak Gašparović A., Lovaković T., Žarković N. (2010) Oxidative stress and antioxidants: biological response modifiers of oxidative homeostasis in cancer. *Periodicum biologorum* **112**(4): 433–439.

Ding H. B. i Xu R. J. (1999) Differentiation of Beef and Kangaroo Meat by Visible/Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Food Science* **64**(5): 814-817.

Domitrović R. (2012) Hepatoprotektivno djelovanje fitokemikalija- pregledni članak. *medicina fluminensis* **48**: 4-14.

Đukić M., Ninković M., Jovanović M. (2008) Oxidative stress – clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry* **27**: 409-425.

Findlay W. P., Bugay D. E. (1998) Utilization of fourier transform-Raman spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **16**: 921–930.

Genestra M. (2007) Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Rewiev. Cellular Signalling* **19**: 1807–1819.

Grdiša M. (2015) Ljekovita kadulja – blago hrvatskog Jadrana. *Gospodarski list*. str. 44-45.

Grünwald J. i Jänicke C. (2006) Zelena ljekarna, Mozaik knjiga. str. 51

Gunaseelan S., Balupillai A., Govindasamy K., Muthusamy G., Ramasamy K., Shanmugam M. i Prasad N. R. (2016) The preventive effect of linalool on acute and chronic UVB-mediated skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Photochemical & Photobiological Sciences* **15**: 851–860.

Gupta R. K., Patel A. K., Shah N., Choudhary A. K., Jha U. K., Yadav U. C., Gupta P. K.,

- Pakuwal U. (2014) Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **15**: 4405-4409.
- Gursky Z. (1999) Zlatna knjiga ljekovitog bilja, 5.izd., Nakladni zavod Matice Hrvatske, str. 354., 366.
- Guthrie DA. History of Medicine. London: Thomas Nelson and Sons Ltd, 1945. str.34
- Halliwell B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* **35**(5): 1147-50.
- Halliwelland B., Gutteridge J. M. C. (2015) Free Radicals in Biology and Medicine, 5.izd., Oxford Science. Publications, Oxford str. 30.
- Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G. Rakesh D. D. (2008) Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International centre for science and high technology, Trieste. str. 21.
- Jafari S. M., Mc Clements D. J. (2017) Nano technology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability. *Adv.Food.Nutr.Res.* **81**: 1-30.
- Jašić M. (2010) Uvod u biološki aktivne komponente hrane. Modul prvi- Biološki aktivni sastojci hrane, dodaci prehrani, funkcionalna hrana i fortifikacija hrane. Materijal uz predavanja. Tehnološki fakultet Tuzla, Sveučilište u Tuzli. str. 56.
- Jednačak T. (2013) Razvoj metodologije vibracijske spektroskopije in-line za praćenje kemijskih reakcija i kristalizacije biološki aktivnih molekula. Doktorski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. str. 5., 11.
- Jednačak T., Novak P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62** (3-4): 71–80.
- Jianu C., Pop G., Gruia A. T., Horhat F. G. (2013) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Lavender (*Lavandula angustifolia*) and Lavandin (*Lavandula x intermedia*) Grown in Western Romania. *International journal of agriculture & biology* **15**: 772–776.
- Kennedy D. O., Wightman E. L. (2011) Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function 1. American Society for Nutrition. *Advances in Nutrition* **2**: 32–50.
- Kliebenstein D. J., Osbourn A. (2012) Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology.* **15**(4): 415-23.
- Kolak I., Šatović Z. (2003) Lavanda u krajobrazu. *Sjemenarstvo*, **20**: 1-2.
- Križanić J. (2005) Fitoterapija, liječenje ljekovitim biljem, Ergon doo, Koprivnica. str. 8., 43.
- Liu R. H. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition* **134**: 24795–34855.

Medved I. (2015) Sve o uzgoju matičnjaka. <<http://www.agroportal.hr/ljekovite-biljke/14908>> Pristupljeno 5. srpnja 2017.

Medved I. (2015) Uvjeti uzgoja lavande. <<http://www.agroportal.hr/ljekovite-biljke/13260>> Pristupljeno 5. srpnja 2017.

Mohamed G. A., Ibrahim S. R. M., Elkhayat E. S., El Dine R. S. (2014) Review article: Natural anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* **52**: 269-284.

Moreno L., Bello R., Primo-Yufera E., Esplugues J. (2002) Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. *Phytotherapy Research* **16**: 10–13.

Nikolić, T. (2013) Sistematska botanika, 5.izd., Alfa, str. 734-740.

Ozaki Y., McClure W. F., Christy A. A. (2007) Near-infrared spectroscopy in Food *Science and Technology*. John Wiley & Sons, New Jersey. str. 4., 9.

Parađiković N. (2014) Ljekovito i začinsko bilje-nastavni materijal za modul Ljekovito i začinsko bilje. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. str. 1.

Radojković M. (2012) Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Morasceae*), sastav, delovanje i primena, disertacija, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom sadu, Novi sad. str. 43-44.

Rajčić K. (2015) Usporedba analize glavnih komponenti i faktorske analize, diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, matematički odsjek. Sveučilište u Zagrebu. str. 3

Ružičkova J., Šustova K. (2006): Determination of selected parameters of quality of the dairy products by NIR spectroscopy. *Czech Journal of Food Sciences* **24**: 255–260

Saporta G., Niang N. (2010) Principal Component Analysis: Application to Statistical Process Control In *Data Analysis*. John Wiley & Sons, Inc. str. 1.

Schaffner W., Hafelfinger B., Ernst B. (1999) Ljekovito bilje: kompendij. Leo-commerce, Rijeka. str. 8

Sun J., Chu Y. F., Wu X., Liu R. H. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 7449–7454.

Šilješ I., Grozdanić Đ., Grgesina I. (1992) Poznavanje, uzgoj i prerade ljekovitog bilja. Školska knjiga. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti. Zagreb. str. 4., 11.

Šiljković, Ž., Rimanić, A. (2005). Geographic Aspects of Medicinal Plants Organic Growing in Croatia. *Geoadria* **10**(1): 53-68.

Toplak-Galle, K. (2001) Ivanka Borovac (ur.), Hrvatsko ljekovito bilje. Mozaik knjiga, Zagreb. str. 12.

Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231-1246.

Valinger, D., Benković, M., Gajdoš Kljusurić, J., Bauman, I., Kurtanjek, Ž. (2011) Application of NIR spectroscopy for monitoring different particle sizes of sucrose. *Journal on processing and energy in agriculture* **15**(3): 188-190.

Venugopal R., Liu R. H. (2012) Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. *Food Science and Human Wellness* **1**: 1–13.

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. Review. *Critical Review in Food Science and Nutrition* **44**: 275-95.

Yang C. L., Or T. C., Ho M. H., Lau A. S. (2013) Scientific basis of botanical medicine as alternative remedies for rheumatoid arthritis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **44**: 284–300.

Zobel A.M. (1997) *Phytochemistry of Fruits and Vegetables* (Tom-Barberan, F.A., Robinson, R.J., ured.), Clarendon Press, Oxford, UK, str. 173-204.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Antonela Režan

ime i prezime studenta